

РЕФОЛДИНГ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ЭКТОДОМЕНА РЕЦЕПТОРА ЭФРИНА A5 МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

Е.В. Бондарюк, ** С. Паавилайнен, О.К. Присяженко, *Ю.-П. Химанен, М.В. Шолух

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

**Институт исследований рака Слоан-Кеттеринг, Нью-Йорк, США*

***Университет Турку, Финляндия*

sholukh@bsu.by; juhhim@utu.fi

Введение

Белки семейства эфринов, к которым относятся эфриновые рецепторы (Eph) и их белковые лиганды – эфрины (ephrlin), играют важную роль в процессах развития и клеточной миграции, участвуют в регуляции ангиогенеза и формировании структуры нервных связей [1, 2]. Нарушение взаимодействия эфринов с их рецепторами также вносит вклад в механизмы канцерогенеза [3]. У позвоночных животных семейство белков Eph включает 14 известных рецепторов, обладающих тирозинкиназной активностью, и 9 лигандов. Эфриновые рецепторы и эфрины подразделяются на 2 класса: рецепторы EphA, предпочтительно взаимодействующие с эфринами класса А, заякоренными на внешней поверхности клетки; и рецепторы EphB, связывающиеся с эфринами класса В, являющимися трансмембранными белками [4]. Для белков этого семейства характерна способность к двунаправленной сигнализации, при которой эфрин и рецептор оба являются как лигандом, так и рецептором [5].

Рецептор EphA5 известен как один из немногих представителей эфринов, который экспрессируется почти исключительно в нервной ткани [6]. Роль, которую играет EphA5 и его лиганды в развитии нервной ткани и формировании аксонов, а также регуляции синаптической пластичности у взрослых организмов, привлекает к нему все более пристальное внимание исследователей в области нейробиологии [7]. Не смотря на то, что уже установлена доменная архитектура данного белка [8], изучены многие его свойства, его взаимодействие с лигандом как и особенности сигнальной трансдукции остаются малоизученными. Не в последнюю очередь это обусловлено трудностями, связанными с получением достаточного количества высокоочищенного белкового препарата. Так, выделение нативного EphA5 в необходимых количествах из тканей животных или клеточных культур представляет собой чрезвычайно трудную задачу ввиду его низкого содержания [9].

Для получения препаративных количеств белка часто используются системы экспрессии на основе микроорганизмов [10, 11]. Недостатком таких систем, однако, является склонность экспрессируемого рекомбинантного белка к образованию телец включения, в которых целевой белок находится в частично или полностью денатурированном состоянии, и должен быть подвергнут процессу рефолдинга в ходе его очистки [12]. В настоящее время для выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантных белков используют широкий спектр методических подходов [12, 13], каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Целью данной работы была разработка способа выделения и рефолдинга рекомбинантного эктодомена рецептора EphA5 из телец включения с применением гель-фильтрационной хроматографии.

Методы исследования

Система экспрессии рекомбинантного белка. Для получения препаративных количеств рекомбинантного эктодомена рецептора EphA5 мыши использовалась система экспрессии на основе штамма *E.coli* Origami B (DE3). Штамм *E.coli*, содержал конструкцию на основе плазмиды pET32 для экспрессии рекомбинантного EphA5, включающего кроме белковой части целевого продукта сайт разрезания для тромбина, poly-His Tag и тиоредоксиновый фрагмент, на N-конце.

Получение бактериальной культуры. Ночную культуру бактерий помещали в ферментер емкостью 4 л. Среда инкубации (pH 7,0, аэрация 25%, 37 °C) содержала 10 г/л бактотриптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl. По достижении оптической плотности при 600 нм величины 0,4 в среду добавляли IPTG до конечной концентрации 0,4 ммоль/л и ферментирование продолжали в течение примерно 4 часов до достижения оптической плотности культуры при 600 нм 0,8-0,9. Клеточную суспензию охлаждали во льду и клетки осаждали центрифугированием при 10000 g и 4 °C в течение 10 минут. Осадок ресуспендировали, один раз отмывали от инкубационной среды 20 ммоль/л HEPES буфером с pH 7,2, замораживали и хранили при – 20 °C до использования.

Разрушение бактериальных клеток. Клетки размораживали, ресуспендировали в охлажденном лизис-буфере, содержащем 20 ммоль/л HEPES (pH 7,2), 10% глицерин, 100 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л MgCl₂, 100 U/мл ДНКазы I, 1 ммоль/л PMSF, 0,1% лизоцим и разрушали с использованием French-press. Клеточный лизат центрифугировали при 20000 g и 4 °C 30 мин. Супернатант отбрасывали, а осадок, содержащий тельца включения промывали 20 ммоль/л HEPES буфером (pH 7,2) и замораживали при – 20 °C до использования.

Солюбилизация телец включения. Тельца включения растворяли в 20 ммоль/л Tris-HCl буфере с pH 8,5, содержащем 500 ммоль/л NaCl, 8 моль/л мочевины, 20 ммоль/л 2-меркаптоэтанол, 25 ммоль/л глицил-глицин, в течение 3 часов при комнатной температуре с перемешиванием. Затем раствор центрифугировали 10 мин при 16000 g, 4 °C и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Рефолдинг. На всех стадиях хроматографического разделения была использована система BioRad BioLogic LP (США). Рефолдинг методом гель-фильтрации проводили согласно методу, описанному Batas [14] на колонке Sephacryl S300 (2,5×110 см), уравновешенной буфером, содержащим 50 ммоль/л Tris-HCl (pH 8,5), 150 ммоль/л NaCl, 15% глицерин, 1 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л 2-меркаптоэтанол. Перед нанесением раствора белка верхняя четверть колонки была заполнена буфером, в котором солюбилизовали тельца включения, этот же буфер использовался в качестве элюирующего. Скорость элюции была 0,5 мл/мин. Фракции собирали по 10 мл, объединяли и концентрировали, используя концентраторы Millipore YM-30 с пределом эксклюзии 30 кДа.

Замена рефолдинг-буфера на тромбиновый буфер. Рефолдинг-буфер удаляли методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25 (2×13 см), уравновешенной тромбиновым буфером, содержащим 20 ммоль/л Tris-HCl (pH 8,4), 150 ммоль/л NaCl, 20% глицерин, 2,5 ммоль/л CaCl₂.

Гидролиз рекомбинантной конструкции тромбином. Для отделения тиоредоксинового фрагмента и poly-His Taq фрагмента от целевого продукта, белок подвергали обработке тромбином [15]. Для этого в раствор с концентрацией белка 2 мг/мл добавляли 1 U тромбина (Restriction grade) и инкубировали 2 часа при комнатной температуре. Реакцию протеолиза останавливали добавлением PMSF и ЭДТА до конечной концентрации 1 ммоль/л и 2 ммоль/л соответственно.

Разделение тиоредоксинового фрагмента с poly-His Taq и эктодомена EphA5. Тиоредоксиновый фрагмент отделяли от эктодомена EphA5 методом гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-100 (1,6×25 см), уравновешенной буфером, содержащим 50 ммоль/л Tris-HCl (pH 7,5), 200 ммоль/л NaCl, 20% глицерин, 2,5 ммоль/л ЭДТА. Фракции элюировали со скоростью 0,5 мл/мин и собирали по 2,5 мл.

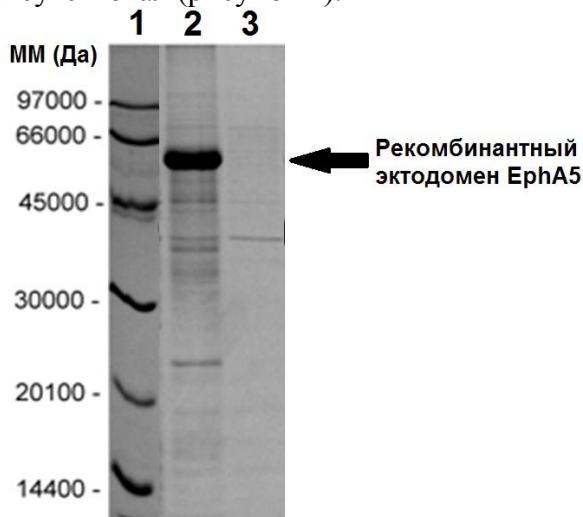
SDS-электрофорез в полиакриламидном геле. Чистоту белковых фракций оценивали методом SDS-электрофореза в 12,5%-ом полиакриламидном геле по стандартной методике [16]. Наличие белковых агрегатов определяли тем же методом за исключением предварительной обработки проб дитиотреитолом и кипячением.

Определение количества белка. Количество белка на всех стадиях определяли методом Лоури в модификации Петерсона [17]. Белок предварительно осаждали, хлорной кислотой в

конечной концентрации 1 моль/л, выдерживали 10 минут на холоду и центрифугировали 10 минут при 16000 g. Осадки белка растворяли в 10% SDS.

Результаты и обсуждение

Структура рекомбинантного эктодомена рецептора эфрина A5 включает тиоредоксиновый фрагмент, poly-His Tag и сайт действия тромбина. Первоначально тиоредоксиновый фрагмент предназначался для обеспечения транспорта экспрессируемого белка в периплазму бактериальной клетки, что теоретически должно обеспечивать его правильный фолдинг и растворимость. Однако, вероятно в результате сверхэкспрессии, имеет место формирование телец включения, в которых целевой белок частично или полностью денатурирован [10–11]. После центрифугирования клеточного лизата рекомбинантный эктодомен EphA5 был обнаружен исключительно в осадке, сформированном тельцами включения, тогда как в надосадочной фракции он полностью отсутствовал (рисунок 1).



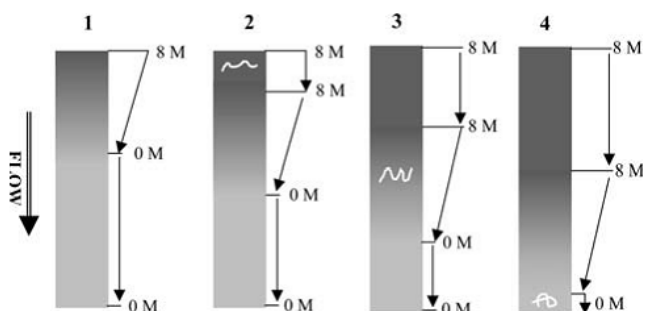
1 – стандарты молекулярной массы;
2 – тельца включения, содержащие рекомбинантный эктодомен EphA5;
3 – супернатант, полученный после осаждения телец включения из клеточного лизата.

Бактериальные клетки разрушали с использованием French-press, тельца включения отделялись центрифугированием при 20000 g и 4 °C в течение 30 мин.

Рисунок 1 – Идентификация рекомбинантного эктодомена EphA5 в фракциях клеточного лизата методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле

Наличие в структуре молекулы рекомбинантного белка poly-His Tag фрагмента предусмотрено для обеспечения возможности очистки целевого продукта за одну стадию методом металл-хелатной хроматографии на Ni-sepharose в том случае если белок находится в растворенной форме [15]. Однако нахождение белка в нерастворимой форме в тельцах включения предполагает, что он частично или полностью денатурирован, то есть не обладает нативной конформацией и должен быть подвергнут процессу рефолдинга для восстановления присущей белку конформации.

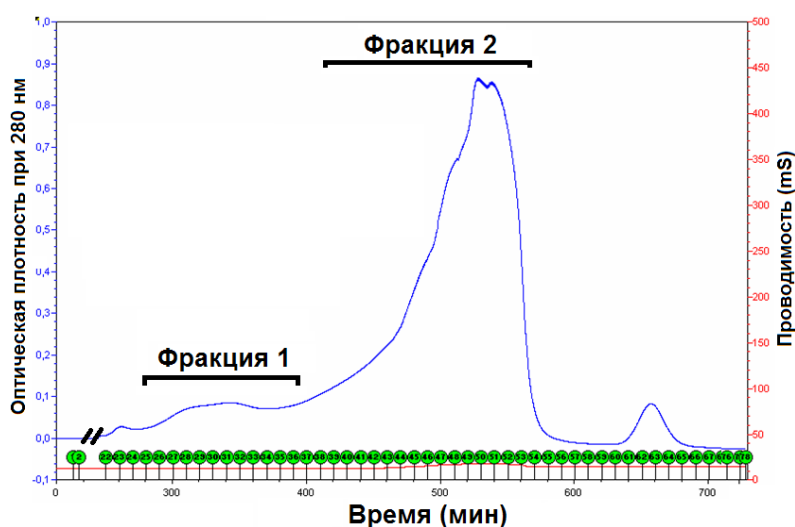
Для рефолдинга данного рекомбинантного белка нами был взят за основу метод гель-фильтрации описанный Li M. и соавт. [18], схематично представленный на рисунке 2.



1 – колонка уравновешена рефолдинг-буфером, верхняя часть заполнена денатурирующим буфером;
2 – внесение раствора белка, в процессе элюции создается градиент мочевины;
3 – белок проходит через снижающийся градиент мочевины; 4 – свернувшийся белок элюируется из колонки.

Рисунок 2 – Схема рефолдинга рекомбинантного белка методом гель-фильтрации согласно [19]

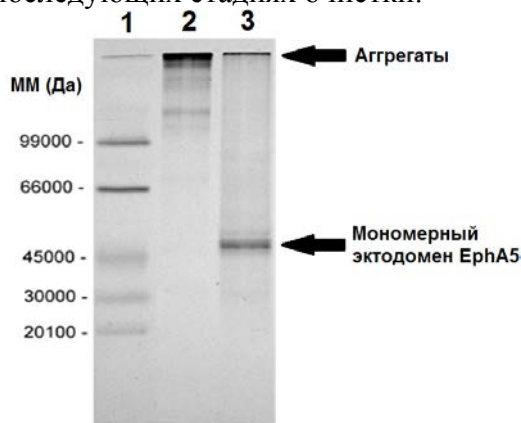
Метод рефолдинга с использованием гель-фильтрации позволяет использовать высокую концентрацию исходного раствора белка, в отличие от наиболее часто применяемого рефолдинга методом разведения [20]. Использованный при этом сорбент Sephacryl S300 имеет достаточный размер пор, чтобы обеспечить проникновение в них денатурированного белка с молекулярной массой порядка 58 кДа, создавая, тем самым, условия для изолирования отдельных белковых молекул друг от друга и их беспрепятственного сворачивания. При этом белковые агрегаты образуются в меньшей степени, что обеспечивает более эффективный рефолдинг. В процессе движения белковых молекул по колонке осуществляется постепенный переход из денатурирующего буфера в буфер, не содержащий хаотропных веществ и способствующий рефолдингу [18–19]. При этом концентрация денатуранта (мочевины) постепенно снижается, позволяя белку приобретать нативную вторичную и третичную структуру с одновременным замыканием дисульфидных связей между остатками цистеина. Еще одним преимуществом данного метода рефолдинга является одновременное удаление высокомолекулярных белковых агрегатов (рисунок 3), которые могли оставаться после недостаточно полной солиubilизации телец включения [14, 21].



Раствор солиubilизованных телец включения наносили на колонку с Sephacryl S-300, уравнированную рефолдинг-буфером. При этом верхняя четверть колонки была заполнена буфером для солиubilизации телец включения, содержащим 8 моль/л мочевины. Белок элюировали тем же буфером со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции собирали в отдельные пробирки по 10 мл и объединяли как показано на хроматограмме (фракции 1 и 2).

Рисунок 3 – Рефолдинг рекомбинантного экто-домена EphA5 методом гель-фильтрации на колонке с Sephacryl S-300

Электрофоретический анализ полученных фракций, проведенный без предварительного разрушения дисульфидных связей таким восстанавливающим агентом как DTT, показал наличие помимо мономерной формы эктодомена рецептора EphA5 также высокомолекулярных агрегатов (рисунок 4), которые, тем не менее, могут быть удалены на последующих стадиях очистки.

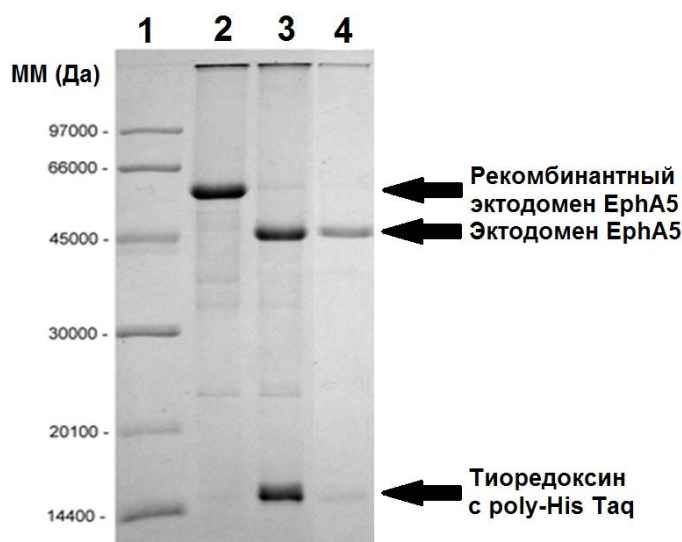


Белковые фракции, полученные после рефолдинга на колонке с Sephacryl S-300 концентрировали и наносили на гель без предварительной обработки в денатурирующих условиях.

- 1 – стандарты молекулярной массы;
- 2 – фракция 1 после Sephacryl S-300;
- 3 – фракция 2 после Sephacryl S-300.

Рисунок 4 – Нативный электрофорез в полиакриламидном геле фракций, полученных после хроматографии на Sephacryl S-300

После проведения рефолдинга тиоредоксиновый фрагмент с poly-His Taq должен быть удален. Для этого в раствор вносили тромбин, который разрезал молекулу рекомбинантного белка в специфическом сайте, находящемся между основной частью молекулы и тиоредоксиновым фрагментом с poly-His Taq. Основываясь на разнице теоретических pI у эктодомена рецептора EphA5 и тиоредоксинового фрагмента, мы предприняли попытку их разделения методом ионообменной хроматографии, однако столкнулись с проблемой неспецифического связывания белка с ионообменными сорбентами. Принимая во внимание существенные различия в значениях молекулярных масс фрагмента poly-His Taq/Thioredoxin и EphA5, было решено для разделения фрагментов, полученных после тромбинового гидролиза, использовать метод гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-100. Данный подход позволил отделить тиоредоксиновый пептид с молекулярной массой ~15 кДа от основного белкового фрагмента эктодомена EphA5 (рисунок 5). Полученная фракция очищенного эктодомена EphA5 содержит не менее 90% целевого белка.



Фракцию 2 полученную после рефолдинга рекомбинантного экто-домена EphA5 на колонке с Sephacryl S-300 подвергали обработке тромбином с последующим отделением poly-His Taq/Thioredoxin фрагмента на колонке с Sephadex G-100.

1 – стандарты молекулярной массы; 2 – исходный рекомбинантный эктодомен EphA5; 3 – продукты тромбинового гидролиза; 4 – очищенный эктодомен EphA5 после элюции с колонки с Sephadex G-100.

Рисунок 5 – SDS-электрофорез в полиакриламидном геле очищенного эктодомена EphA5

Выводы

Генетическая последовательность эктодомена рецептора EphA5, клонированная в плазмиду pEX32, экспрессировалась вместе с тиоредоксиновым фрагментом в штамме *E.coli* Origami B (DE3) в виде телец включения. Белок из телец включения солибилизировали в растворе 8 моль/л мочевины и подвергали рефолдингу используя метод гель-фильтрации на Sephacryl S300. Данный метод позволяет использовать высокую исходную концентрацию белка (10 мг/мл) и эффективно проводить рефолдинг с одновременным отделением целевого продукта от высокомолекулярных белковых агрегатов, в тоже время, обеспечивая необходимые условия для рефолдинга: пространственную изоляцию белковых молекул друг от друга в порах сорбента и плавное снижение концентрации денатурирующего агента (мочевины). Электрофоретический анализ полученных фракций в неденатурирующих условиях продемонстрировал наличие мономерной формы эктодомена рецептора EphA5. Тиоредоксиновый фрагмент и эктодомен EphA5, полученные после протеолиза тромбином разделяли хроматографически используя Sephadex G-100. Описанная технология позволяет провести рефолдинг и получить мономерный EphA5 с чистотой не менее 90%, используя исключительно методы гель-фильтрации.

Благодарности. Наши исследования поддержаны программой Erasmus Mundus - Action 2 MID, грант MID2012B1890(М.В.Шолух) и грант BMUMID2011516(Ю.-П.Химанен)

Список литературы

1. Wilkinson, D.G. Regulation of cell differentiation by eph receptor and ephrin signaling / D.G. Wilkinson // Cell adhesion & migration. – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 339–348.

2. Beyond boundaries-eph:Ephrin signaling in neurogenesis / J. Laussu [et al.] // *Cell adhesion & migration*. – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 349–359.
3. Therapeutic targeting of eph receptors and their ligands / A.W. Boyd [et al.] // *Cell adhesion & migration*. – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 39–62.
4. Nikolov, D.B. Homotypic receptor-receptor interactions regulating eph signaling / D. B. Nikolov, K. Xu, J. P. Himanen // *Cell adhesion & migration*. – 2014. – Vol. 8, № 4. – P. 360–365.
5. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins / J-P. Himanen [et al.] // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2007. – Vol. 19. – P. 534–542.
6. Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system / M.A. Cooper [et al.] // *J Comp Neurol*. – 2009. – Vol. 514, № 4. – P. 310–328.
7. Yamaguchi, Y. Eph receptors in the adult brain / Y. Yamaguchi, E.B. Pasquale // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2014. – Vol. 14. – P. 288–296.
8. Architecture of Eph receptor clusters / J-P. Himanen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2010. – Vol. 107. – P. 10860–10865.
9. Repelling class discrimination: Ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling / J-P. Himanen [et al.] // *Nat. Neurosci*. – 2004. – Vol. 7. – P. 501–509.
10. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* / H. Lilie [et al.] // *Current Opinion in Biotechnology*. – 1998. – Vol. 9. – P. 497–501.
11. Bacterial inclusion bodies: making gold from waste / E. García-Fruitós [et al.] // *Trends Biotechnol*. – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 65–70.
12. Cabrita, L.D. Protein expression and refolding – a practical guide to getting the most out of inclusion bodies / L.D. Cabrita, S.P. Bottomley // *Biotechnol. Annu. Rev*. – 2004. – Vol. 10. – P. 31–50.
13. Особенности выделения и рефолдинга рекомбинантного эфрина-A5 / Е.В. Бондарюк [и др.] // *Труды БГУ*. – 2013. – Том 8, № 1. – P. 170–176.
14. Batas, B. Protein Refolding at High Concentration using size-exclusion chromatography / B. Batas, J.B. Chaudhuri // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1996. – Vol. 50. – P. 16–23.
15. Sulkowski, E. Purification of proteins by IMAC / E. Sulkowski // *Trends in Biotechnology*. – 1985. – Vol. 3, № 1. – P. 1–7.
16. Protein electrophoresis: applications guide. // Hoefer scientific instruments. *Biotechnology and Bioengineering*. – 1994. – P. 17–25.
17. Peterson, G.L. Protein Determination of total protein / G.L. Peterson // *Methods in enzymology*. – 1983. – Vol. 91. – P. 95–119.
18. In vitro protein refolding by chromatographic procedures / M. Li [et al.] // *Protein Expression and Purification*. – 2004. – Vol. 33. – P. 1–10.
19. Middelberg, A.P.J. Preparative protein refolding / A.P.J. Middelberg // *Trends in Biotechnology*. – 2002. – Vol. 20, № 10. – P. 437–443.
20. Clark, E.D.B. Protein refolding for industrial processes / E.D.B. Clark // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2001. – Vol. 12. – P. 202–207.
21. Chromatographic refolding of proteins: molecular action and column control / F. Wang [et al.] // *China Particuology*. – 2005. – Vol. 3, № 6. – P. 337–342.